



## DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

<b>(51) Classification internationale des brevets <sup>6</sup> :</b> <b>A61K 39/00, C07K 16/28, 14/705, C12Q 1/68</b>	<b>A1</b>	<b>(11) Numéro de publication internationale: WO 99/42128</b> <b>(43) Date de publication internationale: 26 août 1999 (26.08.99)</b>
<b>(21) Numéro de la demande internationale:</b> PCT/FR99/00386 <b>(22) Date de dépôt international:</b> 19 février 1999 (19.02.99) <b>(30) Données relatives à la priorité:</b> 98/02071 20 février 1998 (20.02.98) FR 98/09470 24 juillet 1998 (24.07.98) FR <b>(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US):</b> COMMIS- SARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE [FR/FR]; 31-33, rue de la Fédération, F-75015 Paris (FR). <b>(72) Inventeurs; et</b> <b>(73) Inventeurs/Déposants (US seulement):</b> CAROSELLA, Edgardo, Delfino [FR/FR]; 23, rue George Sand, F-75016 Paris (FR). DAUSSET, Jean [FR/FR]; 9, rue Villersexel, F-75007 Paris (FR). MOREAU, Philippe [FR/FR]; 8, rue Bougainville, F-91170 Viry-Chatillon (FR). PAUL, Pascale [FR/FR]; 29, rue de la Grange aux Belles, F-75010 Paris (FR). ROUAS-FREISS, Nathalie [FR/FR]; 44, boulevard Arago, F-75013 Paris (FR). <b>(74) Mandataires:</b> ORES, Béatrice etc.; Cabinet Orès, 6, avenue de Messine, F-75008 Paris (FR).	<b>(81) Etats désignés:</b> CA, JP, US, brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). <b>Publiée</b> <i>Avec rapport de recherche internationale.</i>	
<b>(54) Title: METHOD FOR SELECTING TUMOURS EXPRESSING HLA-G, SENSITIVE TO ANTICANCER TREATMENT AND USES</b> <b>(54) Titre: METHODE DE SELECTION DE TUMEURS EXPRIMANT HLA-G, SENSIBLES A UN TRAITEMENT ANTI-CANCEREUX ET SES APPLICATIONS</b> <b>(57) Abstract</b> <p>The invention concerns a method for selecting tumours expressing HLA-G, sensitive to an anticancer treatment, which inhibits or prevents the HLA-G activity of said tumours and the uses thereof. Said method enable to establish either the HLA-G transcription profile of a solid tumour or the HLA-G expression profile of a solid tumour. The method for establishing the HLA-G transcription profile consists in: (i) drawing a tumoral sample; (ii) extracting the mRNA; (iii) reverse transcription (RT) of said RNA; (iv) successive or simultaneous amplification of the cDNA's obtained in (iii) in the presence of primers specific to each HLA-G isoform and analysing the resulting amplification products, by electrophoresis and/or specific hybridisation and (v) establishing said sample HLA-G transcription profile. The method for establishing the HLA-G expression profile consists in: (i) drawing a tumoral sample; (ii) optionally marking said sample cells; (iii) carrying out a lysis of the cells; (iv) contacting said cells which have been subjected to lysis with different antibodies directed against the class I HLA-G antigens, to form, optionally HLA-G isoform/antibodies complexes; and (v) establishing said sample HLA-G expression profile by detecting the complexes formed in step (iv).</p> <b>(57) Abrégé</b> <p>Méthode de sélection de tumeurs solides exprimant HLA-G, sensibles à un traitement anticancéreux, qui inhibe ou prévient l'activité HLA-G desdites tumeurs solides et ses applications. Ladite méthode permet d'établir soit le profil de transcription HLA-G d'une tumeur solide, soit le profil d'expression HLA-G d'une tumeur solide. La méthode d'établissement du profil de transcription HLA-G comprend: (i) le prélèvement d'un échantillon tumoral; (ii) l'extraction de l'ARNm; (iii) la transcription inverse (RT) dudit ARN; (iv) les amplifications successives ou concomitantes des ADNc obtenus en (iii), en présence d'amorces spécifiques de chaque isoforme d'HLA-G et l'analyse des produits d'amplification obtenus, par électrophorèse et/ou hybridation spécifique et (v) l'établissement du profil de transcription HLA-G dudit échantillon. La méthode d'établissement du profil d'expression HLA-G comprend: le prélèvement d'un échantillon tumoral, (ii) éventuellement le marquage des cellules dudit échantillon, (iii) la lyse des cellules, (iv) la mise en contact des cellules lysées avec différents anticorps dirigés contre les antigènes HLA de classe I, pour former, éventuellement des complexes isoforme d'HLA-G/anticorps et (v) l'établissement du profil d'expression HLA-G dudit échantillon, par détection des complexes formés à l'étape (iv).</p>		

# **UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION**

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Bésil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroun	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Libéria	SG	Singapour		
EE	Estonie						

# METHODE DE SELECTION DE TUMEURS EXPRIMANT HLA-G, SENSIBLES A UN TRAITEMENT ANTICANCEREUX ET SES APPLICATIONS.

La présente invention est relative à une méthode de sélection de  
5 tumeurs solides sensibles à un traitement anticancéreux, qui inhibe ou prévient  
l'activité HLA-G desdites tumeurs solides et ses applications.

Les antigènes du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH), se  
divisent en plusieurs classes, les antigènes de classe I (HLA-A, HLA-B et HLA-C) qui  
présentent 3 domaines globulaires ( $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  et  $\alpha 3$ ), et dont le domaine  $\alpha 3$  est associé à  
10 la  $\beta 2$  microglobuline, les antigènes de classe II (HLA-DP, HLA-DQ et HLA-DR) et  
les antigènes de classe III (complément).

Les antigènes de classe I comprennent, outre les antigènes précités,  
d'autres antigènes, dits antigènes de classe I non classiques, et notamment les anti-  
gènes HLA-E, HLA-F et HLA-G ; ce dernier, en particulier, est exprimé par les  
15 trophoblastes extravilleux du placenta humain normal et les cellules épithéliales  
thymiques.

La séquence du gène HLA-G (gène HLA-6.0) a été décrite par  
GERAGHTY et al., (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1987, 84, 9145-9149) : il comprend  
4396 paires de bases et présente une organisation intron/exon homologue à celle des  
20 gènes HLA-A, -B et -C. De manière plus précise, ce gène comprend 8 exons, 7 introns  
et une extrémité non traduite 3' ; les 8 exons correspondent respectivement à : exon 1 :  
séquence signal, exon 2 : domaine extracellulaire  $\alpha 1$ , exon 3 : domaine extracellulaire  
 $\alpha 2$ , exon 4 : domaine extracellulaire  $\alpha 3$ , exon 5 : région transmembranaire, exon 6 :  
domaine cytoplasmique I, exon 7 : domaine cytoplasmique II (non traduit), exon 8 :  
25 domaine cytoplasmique III (non traduit) et région 3' non traduite (GERAGHTY et al.,  
précité; ELLIS et al., J. Immunol., 1990, 144, 731-735 ; KIRSZENBAUM M. et al.,  
*Oncogeny of hematopoiesis. Aplastic anemia* Eds. E. Gluckman, L. Coulombel, Col-  
loque INSERM/John Libbey Eurotext Ltd). Toutefois le gène HLA-G diffère des au-  
tres gènes de classe I, en ce que le codon de terminaison de traduction, en phase, est  
30 localisé au niveau du deuxième codon de l'exon 6 ; en conséquence, la région cyto-

plasmique de la protéine codée par ce gène HLA-6.0 est considérablement plus courte que celle des régions cytoplasmiques des protéines HLA-A, -B et -C.

Ces antigènes HLA-G sont essentiellement exprimés par les cellules cytotrophoblastiques du placenta et sont considérés comme jouant un rôle dans la protection du fœtus (absence de rejet par la mère). En outre, dans la mesure où l'antigène HLA-G est monomorphique, il peut également être impliqué dans la croissance ou la fonction des cellules placentaires (KOVATS et al., Science, 1990, 248, 220-223).

D'autres recherches concernant cet antigène non classique de classe I (ISHITANI et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1992, 89, 3947-3951) ont montré que le transcrit primaire du gène HLA-G peut être épissé de plusieurs manières et produit au moins 3 ARNm matures distincts : le transcrit primaire d'HLA-G fournit une copie complète (G1) de 1 200 pb, un fragment de 900 pb (G2) et un fragment de 600 pb (G3).

Le transcrit G1 ne comprend pas l'exon 7 et correspond à la séquence décrite par ELLIS et al. (précité), c'est-à-dire qu'il code une protéine qui comprend une séquence leader, trois domaines externes, une région transmembranaire et une séquence cytoplasmique. L'ARNm G2 ne comprend pas l'exon 3, c'est-à-dire qu'il code une protéine dans laquelle les domaines  $\alpha 1$  et  $\alpha 3$  sont directement joints ; l'ARNm G3 ne contient ni l'exon 3, ni l'exon 4, c'est-à-dire qu'il code une protéine dans laquelle le domaine  $\alpha 1$  et la séquence transmembranaire sont directement joints.

L'épissage qui prévaut pour l'obtention de l'antigène HLA-G2 entraîne la jonction d'une adénine (A) (provenant du domaine codant  $\alpha 1$ ) avec une séquence AC (issue du domaine codant  $\alpha 3$ ), ce qui entraîne la création d'un codon AAC (asparagine) à la place du codon GAC (acide aspartique), rencontré au début de la séquence codant le domaine  $\alpha 3$  dans HLA-G1.

L'épissage généré pour l'obtention de HLA-G3 n'entraîne pas la formation d'un nouveau codon dans la zone d'épissage.

Les Auteurs de cet article ont également analysé les différentes protéines exprimées : les 3 ARNm sont traduits en protéine dans la lignée cellulaire .221-G.

Certains des Inventeurs ont montré l'existence d'autres formes épissées d'ARNm d'HLA-G : le transcrit HLA-G4, qui n'inclut pas l'exon 4 ; le transcrit HLA-G5, qui inclut l'intron 4, entre les exons 4 et 5, provoquant ainsi une modification du cadre de lecture, lors de la traduction de ce transcrit et en particulier  
5 l'apparition d'un codon stop, après l'acide aminé 21 de l'intron 4 ; et le transcrit HLA-G6, possédant l'intron 4, mais ayant perdu l'exon 3 (KIRSZENBAUM M. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1994, 91, 4209-4213 ; Demande Européenne EP 0 677 582 ; KIRSZENBAUM M. et al., *Human Immunol.*, 1995, 43, 237-241 ; MOREAU P. et al., *Human Immunol.* 1995, 43, 231-236) ; ils ont également montré que ces différents  
10 transcrits sont exprimés dans plusieurs types de cellules humaines fœtales et adultes, notamment dans les lymphocytes (KIRSZENBAUM M. et al., *Human Immunol.*, 1995, précité ; MOREAU P. et al., *Human Immunol.* 1995, précité).

Certains des Inventeurs ont également montré que les cellules NK n'expriment aucun transcrit HLA-G (TEYSSIER M. et al., *Nat. Immunol.*, 1995, 14,  
15 262-270 ; MOREAU P. et al., *Human Immunol.*, 1997, 52, 41-46).

Il existe donc au moins 6 ARNms HLA-G différents qui codent potentiellement 6 isoformes protéiques d'HLA-G, dont 4 membranaires (HLA-G1, G2, G3 et G4) et 2 solubles (G5, G6).

Bien que le fœtus puisse être considéré comme une semiallogreffe,  
20 les cellules fœtales survivent et ne sont pas rejetées par la mère ; il est apparu que les molécules HLA-G, exprimées à la surface des trophoblastes protègent les cellules fœtales de la lyse par les cellules *natural killer* (NK) maternelles de la decidua utérine et du sang périphérique (CAROSELLA E.D. et al., *C.R. Acad. Sci.*, 318, 827-830 ; CAROSELLA E.D. et al ; *Immunol. Today*, 1996, 407-409 ; ROUAS-FREISS N. et  
25 al., *PNAS*, 1997, 94, 5249-5254).

Des études antérieures ont montré que l'expression des molécules HLA-G à la surface de cellules cibles transfectées permet de protéger lesdites cellules cibles de l'activité lytique des cellules NK de la couche déciduale de l'endomètre maternel (CHUMBLEY G. et al., *Cell Immunol.*, 1994, 155, 312-322 ; DENIZ G. et  
30 al., *J. Immunol.*, 1994, 152, 4255-4261 ; ROUAS-FREISS N. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1997, 94, 5249-5254). Il est à noter que ces cellules cibles sont obtenues par

transfection avec des vecteurs comprenant soit l'ADN génomique de HLA-G, générant potentiellement tous les transcrits alternatifs, soit avec des vecteurs contenant les ADNc HLA-G1 et HLA-G2 codant les isoformes protéiques HLA-G1 et HLA-G2 (Demande de Brevet Européen n° 0 677 582 et Demande PCT/FR98/00333).

5 Les cellules NK expriment des récepteurs des molécules du CMH de classe I (*killer inhibitory receptors* ou KIR ou NKIR pour récepteurs inhibiteurs NK), qui sont responsables de l'inhibition de la cytotoxicité, lorsque ces molécules HLA, agissant comme ligands, sont reconnues par ces récepteurs ; par exemple, N. ROUAS-FREISS et al. (Proc. Natl. Acad. Sci., 1997, 94, 5249-5254) ont montré  
10 que l'expression de HLA-G protégeait de la lyse, les cellules cibles K562 (lignée cellulaire érythroleucémique humaine), transfectées par les isoformes HLA-G1 et G2. Ces cellules sont habituellement sensibles aux cellules NK.

Ces résultats attestent du rôle fondamental de la molécule HLA-G en tant qu'antigène d'immunotolérance. Ces résultats ont été élargis à l'ensemble des  
15 isoformes membranaires. Les ADNc codant pour les isoformes HLA-G1, G2, G3, G4 exprimés après transfection dans différents types cellulaires, en particulier, les cellules K562 et les cellules tumorales M8 transfectées inhibent les fonctions cytotoxiques NK et CTL.

Compte tenu du rôle important que peut jouer la molécule HLA-G,  
20 les Inventeurs, poursuivant leurs travaux ont plus particulièrement étudiés les cellules tumorales et se sont notamment donnés pour but de pourvoir à des outils de sélection des tumeurs solides sensibles à un traitement qui inhibe les antigènes HLA-G, présents notamment sur certaines tumeurs.

La présente invention a pour objet une méthode d'établissement du  
25 profil de transcription HLA-G d'une tumeur solide en vue de la sélection d'un traitement adapté à ladite tumeur et/ou en vue de la surveillance de l'évolution de ladite tumeur, caractérisée en ce qu'elle comprend :

- (i) le prélèvement d'un échantillon tumoral ;
- (ii) l'extraction de l'ARNm, à partir dudit échantillon ; on peut utili-  
30 ser notamment, une méthode modifiée de Chomczynski et Sacchi, en utilisant le réactif RNA NOW (Ozyme, France) ;

(iii) la transcription inverse (RT) dudit ARN ;

(iv) les amplifications successives ou concomitantes des ADNc obtenus en (iii), en présence d'amorces spécifiques de chaque isoforme d'HLA-G et l'analyse des produits d'amplification obtenus, par électrophorèse et/ou hybridation

5 spécifique et

(v) l'établissement du profil de transcription HLA-G dudit échantillon.

De manière préférée, les transcriptions inverses sont amorcées avec des oligo-dT sur de l'ARNm, préalablement dénaturé, par exemple à 65°C, en présence d'une transcriptase inverse, telle que la transcriptase inverse M-MLV  
10 (Gibco-BRL, Life technologies).

Également de manière préférée, l'amplification des ADNc est réalisée par polymérisation en chaîne (PCR), en utilisant des amorces spécifiques des différentes isoformes d'HLA-G, conformément aux Tableaux suivants :

Amorces	Séquences nucléotidiques	Températures d'hybridation (°C)	Isoformes amplifiées
G.257 G3.U	5'-GGAAGAGGAGACACGGAACA 5'-GGCTGGTCTCTGCACAAAGAGA	61	G1, G2, G3, G4, G5, G6
G.526 G3.U	5'-CCAATGTGGCTGAACAAAGG 5'-GGCTGGTCTCTGCACAAAGAGA	61	G1, G4, G5
G.-3-4 G3.U	5'-ACCAGAGCGAGGCCAAGCAG 5'-GGCTGGTCTCTGCACAAAGAGA	65	G3
G.-3 G3.U	5'-ACCAGAGCGAGGCCAACCCC 5'-GGCTGGTCTCTGCACAAAGAGA	65	G2, G6
G.-3 G.i4b	5'-ACCAGAGCGAGGCCAACCCC 5'-AAAGGAGGTGAAGGTGAGGG	61	G6
G.526 G.i4b	5'-CCAATGTGGCTGAACAAAGG 5'-AAAGGAGGTGAAGGTGAGGG	61	G5

Sondes	Séquences nucléotidiques	Températures d'hybridation (°C)	Isoformes détectées
GR	5'-GGTCTGCAGGTTCAATTCTGTC	60	HLA-G1, G2, G3, G4, G5, G6
G.647 F	5'-CCACCACCCTGTCTTTGACT	60	HLA-G1, G2, G5, G6
G.14 F	GAGGCATCATGTCTGTTAGG	55	HLA-G5, G6
G.927 F	5'-ATCATGGGTATCGTTGCTGG	55	HLA-G1, G2, G3, G4, G5 et G6

Les Inventeurs ont trouvé, de manière surprenante, qu'au moins certaines tumeurs solides expriment l'antigène HLA-G et ont montré que cet antigène HLA-G joue un rôle fonctionnel dans la protection des cellules tumorales (tumeurs solides) de la destruction par les cellules NK. Ils ont en outre montré la présence effective de certaines des isoformes d'HLA-G à la surface desdites cellules tumorales.

Toutefois, également de manière surprenante, selon les lignées tumorales, le profil HLA-G (transcrits et protéines) sera différent.

Par exemple, dans certaines lignées de mélanome, on peut observer la présence des isoformes HLA-G2/G4 et G3, qui protègent ces lignées de la lyse cellulaire induite par les cellules NK, comme le fait l'isoforme HLA-G1, dans d'autres lignées.

Dans d'autres lignées, l'ensemble des transcrits HLA-G sont détectés. La forme protéique HLA-G1 est détectée par immunofluorescence avec un anticorps anti-HLA-G et inhibe la lyse NK.

L'analyse de biopsies de patients atteints de mélanomes révèle un taux de transcrits élevé HLA-G dans certaines tumeurs (primitives et métastases) associé à une forte expression de la protéine HLA-G1 détectable en immunohistochimie sur coupes congelées avec un anticorps anti-HLA-G1.

Cette transcription et expression élevée HLA-G est spécifique du tissu tumoral et n'est pas détectée dans le tissu sain.



Dans certains mélanomes, on observe une dissociation de la transcription des isoformes solubles (G5) et membranaires. L'analyse des patients révèle 4 profils de transcription et d'expression HLA-G.

Profils de transcription	Formes membranaires HLA-G1, G2, G3, G4	Formes solubles
Profil 1	-	-
2	++	-
3	-	++
4	++	++

5

L'expression de la protéine soluble est détectée en immunohistochimie sur les patients présentant le profil P4.

La présente invention a également pour objet une méthode d'établissement du profil d'expression HLA-G d'une tumeur solide, en vue de la  
 10 sélection d'un traitement adapté à ladite tumeur et/ou en vue de la surveillance de l'évolution de ladite tumeur, caractérisée en ce qu'elle comprend :

- (i) le prélèvement d'un échantillon tumoral,
- (ii) la préparation d'une coupe histologique à partir dudit échantillon,

15

(iii) le marquage des cellules de l'échantillon obtenu en (ii) avec des anticorps spécifiques d'isoformes membranaires et solubles HLA-G, et

(iv) l'établissement du profil d'expression HLA-G dudit échantillon, par détection des cellules marquées.

La présente invention a également pour objet une méthode  
 20 d'établissement du profil d'expression HLA-G d'une tumeur solide, en vue de la sélection d'un traitement adapté à ladite tumeur et/ou en vue de la surveillance de l'évolution de ladite tumeur, caractérisée en ce qu'elle comprend :

- (i) le prélèvement d'un échantillon tumoral,
- (ii) éventuellement le marquage des cellules dudit échantillon,
- (iii) la lyse des cellules,

25

(iv) la mise en contact des cellules lysées avec différents anticorps dirigés contre les antigènes HLA de classe I, pour former, éventuellement des complexes isoforme d'HLA-G/anticorps, et

(v) l'établissement du profil d'expression HLA-G dudit échantillon,  
5 par détection des complexes formés à l'étape (iv).

De manière préférée, à l'étape (iv), on obtient des immunoprécipités, qui sont séparés, à l'étape (v) par électrophorèse, transférés sur membrane et détectés.

Conformément à l'invention, lesdits anticorps sont de préférence des anticorps monoclonaux.

10 La recherche d'une expression des HLA-G par certaines cellules tumorales et/ou des cellules infiltrant la tumeur (macrophages, cellules dendritiques) permet de mieux évaluer le type de traitement potentiellement efficace.

En effet, la connaissance du profil de transcription de l'expression HLA-G d'une tumeur solide est cruciale pour choisir le meilleur traitement possible et  
15 suivre l'évolution de la tumeur en fonction dudit traitement.

La présente invention a également pour objet une méthode de sélection de facteurs de régulation de la transcription et/ou de l'expression des HLA-G par des cellules tumorales (inhibition), laquelle méthode est caractérisée en ce qu'elle comprend :

20 (i) le prélèvement d'un échantillon tumoral,  
(ii) l'isolement des cellules tumorales à partir dudit échantillon,  
(iii) la mise en culture primaire des cellules tumorales obtenues en  
(ii),

(iv) l'addition de la substance à tester,  
25 (v) la visualisation de l'effet obtenu par l'établissement du profil de transcription et/ou d'expression HLA-G desdites cellules tumorales après traitement avec ladite substance à tester, et

(vi) le test *in vitro* de l'effet du traitement sur la réponse anti-tumorale (réponses NK et CTL).

30 De manière avantageuse, les lignées cellulaires dérivées des biopsies permettent d'évaluer la sensibilité à un traitement *in vitro*, de déterminer les agents

susceptibles de réduire l'expression HLA-G (outil de criblage) dans l'objectif de rétablir une meilleure réponse antitumorale, dans le cas de cellules tumorales HLA-G positives.

De telles cellules servent avantageusement de modèle d'étude de la transcription et/ou de l'expression des HLA-G.

La présente invention a également pour objet une méthode de surveillance de l'évolution d'une tumeur exprimant HLA-G, caractérisée en ce qu'elle comprend le dosage de la forme soluble d'HLA-G dans les sérums de patients, en tant que facteur pronostic de la dissémination tumorale ou de la capacité d'une tumeur à former des métastases.

Ledit dosage est de préférence réalisé par une méthode immunologique conventionnelle, mettant en œuvre des anticorps anti-HLA-G soluble.

La présente invention a également pour objet un vaccin anti-tumoral, apte à être utilisé dans les tumeurs solides exprimant au moins une isoforme d'HLA-G, caractérisé en ce qu'il est sélectionné dans le groupe constitué par des cellules tumorales autologues ou un antigène HLA-G5 soluble ou un fragment de celui-ci ; de tels vaccins induisent la formation de lymphocytes T cytotoxiques, spécifiques de tumeurs et d'anticorps anti-HLA-G.

Lorsque ledit vaccin est constitué de cellules autologues (notamment des cellules tumorales de l'individu à traiter exprimant au moins une isoforme d'HLA-G), lesdites cellules sont de préférence modifiées de manière à induire effectivement la production d'anticorps anti-HLA-G. Les cellules sont par exemple soumises à un traitement au cholestérol ou à un traitement hyperbare.

De manière avantageuse, ledit antigène HLA-G soluble ou un fragment de celui-ci est couplé à une protéine appropriée et éventuellement associé à un adjuvant tel que l'hydroxyde d'aluminium ou le phosphate de calcium.

Ledit vaccin est de préférence administré par voie sous-cutanée ou intra-dermique.

La présente invention a également pour objet une composition antitumorale, apte à être utilisée dans des tumeurs solides exprimant au moins une iso-

forme d'HLA-G, caractérisée en ce qu'elle est essentiellement constituée d'anticorps anti-HLA-G (immunothérapie passive).

La présente invention a également pour objet une composition anti-tumorale, apte à être utilisée dans des tumeurs solides exprimant au moins une iso-  
5 forme d'HLA-G, caractérisée en ce qu'elle est essentiellement constituée par au moins un facteur de régulation de la transcription et/ou de l'expression des HLA-G.

Selon un mode de réalisation avantageux de ladite composition, ledit facteur de régulation est sélectionné dans le groupe constitué par les facteurs de régulation obtenus à l'aide de la méthode telle que définie ci-dessus, les facteurs antago-  
10 nistes des agents d'activation des HLA-G, identifiés par les Inventeurs [interleukine-10, glucocorticoïde, interférons, action du stress (radiations, choc thermique, métaux lourds, stress oxydatif)], les acides nucléiques anti-sens et les inhibiteurs hormonaux de la transcription et/ou de l'expression desdites HLA-G.

La présente invention a en outre pour objet des produits contenant  
15 des anticorps anti-HLA-G et des facteurs de régulation de l'expression des HLA-G, comme produits de combinaison pour une utilisation simultanée, séparée ou étalée dans le temps, dans le traitement des tumeurs solides exprimant au moins une isoforme d'HLA-G.

Lesdits facteurs de régulation sont tels que ceux définis ci-dessus.

20 Outre les dispositions qui précèdent, l'invention comprend encore d'autres dispositions, qui ressortiront de la description qui va suivre, qui se réfère à des exemples de mise en œuvre de la présente invention ainsi qu'aux dessins annexés dans lesquels :

- la figure 1 illustre :

25 (A) : l'analyse RT-PCR des ARNm des isoformes d'HLA-G dans les cellules de mélanome. Des amorces pan-HLA-G [amorce G.257 (exon 2) et 3G.U (extrémité 3' non-traduite)] sont utilisées pour l'amplification PCR des transcrits HLA-G correspondants aux différentes isoformes connues d'HLA-G. L'ADNc des cellules de choriocarcinome JEG-3, les trophoblastes du premier trimestre (TRO) et  
30 les cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC) sont utilisés comme cellules contrôles respectivement pour les taux de transcription élevés et les taux de transcrip-

tion basals d'HLA-G. IgR, M8, DRAN et M74 correspondent à l'amplification de l'ADNc de lignées cellulaires de mélanomes. Les bandes HLA-G spécifiques sont révélées par hybridation avec la sonde GR-spécifique, localisée au niveau de l'exon 2. Les bandes correspondant aux transcrits HLA-G1, G2, G3, G4 et G5 sont indiquées  
5 par des flèches. Les produits de la PCR, co-amplifiés au cours de la même réaction, avec les amorces de la  $\beta$ -actine sont détectés sur la même membrane à l'aide d'une sonde  $\beta$ -actine ;

(B) : cette figure correspond à la détection RT-PCR des transcrits alternatifs dans les cellules de mélanome. L'amorce 3 est spécifique des isoformes  
10 HLA-G2 et HLA-G2 soluble (G6) qui ne possèdent pas l'exon 3. L'amorce 3.4 permet de distinguer les transcrits ARNm HLA-G3. Les amorces G.526 et I4b amplifient de manière spécifique le transcrit HLA-G5, qui correspond à la forme soluble. Les produits de la PCR, co-amplifiés dans la même réaction avec les amorces de la  $\beta$ -actine, sont détectés sur la même membrane par une sonde spécifique de la  $\beta$ -actine ;

(C) : cette figure correspond à l'analyse RT-PCR de l'ARNm HLA-G dans des cellules de mélanome. Des amorces pan-HLA-G [amorce G.257 (exon 2) et 3G.U (extrémité 3' non-traduite)] sont utilisées pour l'amplification PCR des transcrits HLA-G correspondants aux différentes isoformes connues d'HLA-G. L'ADNc des cellules de choriocarcinome JEG-3, sont utilisés comme cellules  
20 contrôles pour les taux de transcription élevés. IgR, M8 et DRAN correspondent à l'amplification de l'ADNc de lignées cellulaires de mélanome. Les bandes HLA-G spécifiques sont révélées par hybridation avec la sonde GR-spécifique, localisée au niveau de l'exon 2. Les bandes correspondant aux transcrits HLA-G1, G2, G3, G4 et G5 sont indiquées par des flèches. Les produits de la PCR, co-amplifiés au cours de la  
25 même réaction, avec les amorces de la  $\beta$ -actine sont détectés sur la même membrane à l'aide d'une sonde  $\beta$ -actine.

- la figure 2 illustre l'analyse RT-PCR des ARNm des isoformes d'HLA-G dans les biopsies de métastases de mélanome (analyse *in vivo* et *ex vivo* de la peau). Les amorces pan-HLA-G G.257 et 3G.U sont utilisées pour l'amplification  
30 RT-PCR des transcrits HLA-G, à partir de métastases de peau *ex vivo* (MEL) et à partir de biopsies de peau saine, du même patient (HS) ; des cellules JEG-3 et des

trophoblastes du premier trimestre sont utilisés comme contrôles (taux élevé de transcription HLA-G). Les bandes spécifiques HLA-G sont révélées par hybridation avec une sonde GR-spécifique, localisée dans l'exon 2. Les bandes correspondant aux transcrits HLA-G1, G2, G3, G4 et G5 sont indiquées par des flèches.

5                   - la figure 3 illustre la détection des protéines HLA-G1 dans les cellules JEG-3 mais pas dans les cellules de mélanomes IGR et M8 à l'aide de l'anticorps monoclonal W6/32 : les protéines de surface biotinylées de mélanome et les cellules JEG-3 sont immunoprécipitées avec l'anticorps monoclonal W6/32 ; les immunoprécipités sont séparés par SDS-PAGE à 12 % et transférés sur membrane de  
10 cellulose. Les molécules de surface de classe I sont détectées avec de la peroxydase conjuguée à de la streptavidine.

                  - la figure 4 illustre l'immunoprécipitation des isoformes HLA-G des cellules de mélanomes IGR par un anticorps monoclonal dirigé contre la chaîne lourde d'HLA-G libre et par les anticorps monoclonaux 4H84 et HCA2. Les cellules  
15 sont marquées pendant 30 min, immunoprécipitées avec les anticorps spécifiques et les immunoprécipités sont analysés par SDS-PAGE à 10 %. L'anticorps 4H84, qui réagit avec la chaîne lourde HLA-G (bande de 39 kDa dans les cellules JEG-3), présente des réactions croisées avec les chaînes lourdes d'HLA-A, B et/ou C (bande de 45 kDa dans toutes les cellules testées).

20                   - la figure 5 illustre :

                  (A) : l'effet de l'expression HLA-G dans le mélanome IGR sur la sensibilité à la lyse par le clone YT2C2-PR. Les cellules K562 transfectées, soit avec le vecteur seul, soit avec le vecteur HLA-G1 contenant l'ADNc ou le vecteur HLA-G2 et les lignées M8, M74 et IGR, DRAN sont utilisées comme cellules cibles (T). Le  
25 clone YT2C2-PR est utilisé comme cellule effectrice (E) dans un rapport cellule effectrice/cellule cible (E/T) de 50/1. Les résultats sont exprimés comme le pourcentage de lyse enregistré en 4 h dans un test de libération du chrome 51. La libération spontanée n'excède jamais 10 % de la libération maximale. Cette expérience est réalisée au moins 5 fois et produit à chaque fois les mêmes résultats ;

30                   (B) : l'inhibition de la lyse induite par le clone YT2C2-PR est due à un signal « off » transmis par les cellules IGR et DRAN. La lignée M8 est utilisée

comme cellule cible (T), marquées au chrome. Le clone YT2C2-PR est utilisé comme cellule effectrice (E) dans un rapport E/T de 50:1. Les cellules IGR et DRAN sont ajoutées en tant que cellules inhibitrices dans un rapport cellule inhibitrice/cellule cible de 100, 50 et 25:1. 0 indique qu'aucune cellule IGR n'a été ajoutée dans le test ;

5 (C) : l'inhibition de la lyse induite par des cellules de mélanome HLA-G positives (cellules cibles T). Cette figure illustre plus particulièrement l'effet de l'expression HLA-G par des cellules de mélanome IGR et DRAN sur la sensibilité à la lyse par le clone YT2C2-PR. Plusieurs lignées cellulaires B-EBV HLA-G négatives [HOM (A3, B27, Cw1), BM (A29, B61, Cw2), SPO (A3, B7, Cw7), SWE (A2, 10 B44, Cw5)] sont lysées par le clone YT2C2-PR. Ce clone est utilisé comme cellule effectrice (E) dans un rapport E/T de 50/1. Les résultats sont exprimés comme le pourcentage de lyse enregistré en 4 h dans un test de libération du chrome 51. La libération spontanée n'excède jamais 10 % de la libération maximale ;

(D) et (E) : ces figures montrent que les cellules tumorales HLA-G 15 négatives M8 transfectées par les ADNc codant pour les molécules G1, G2, G3, G4 inhibent la lyse NK (figure 5E) et les réponses T cytotoxiques (figure 5D). La figure 5D comprend en abscisse les rapports cellules effectrices (E) (lignées HLA-A2 restreintes spécifiques d'un peptide de la grippe)/cellules cibles (T) (lignées M8 transfectées) et en ordonnée le pourcentage de lyse spécifique. Le Tableau ci-après 20 correspond aux valeurs obtenues sur cette figure.

Rapport E/T	M8-RSV	G1	G2	G3	G4	Génomique
15/1	55 %	8 %	39 %	12 %	17 %	30 %
7/1	52 %	6 %	42 %	10 %	14 %	25 %
3/1	29 %	2 %	30 %	6 %	12 %	23 %

La figure 5E comprend en abscisse les rapports cellules effectrices (E) (clone YT2C2-PR)/cellules cibles (T) (lignées M8 transfectées) et en ordonnée le pourcentage de lyse spécifique.

25 - la figure 6 illustre la détection de transcrits HLA-G dans des biopsies de mélanomes humains. Les amplifications RT-PCR sont réalisées en utilisant les amorces G.257 et G.3U précitées, à partir de biopsies de peau saine (HS) et de

ganglions lymphatiques sains (HLN) d'une part et de biopsies de métastases de ganglions lymphatiques (LNM1 et LNM2). Les cellules de choriocarcinome JEG-3 sont utilisées comme cellules contrôles pour les taux de transcription élevés. Des bandes HLA-G spécifiques sont révélées par hybridation avec la sonde GR-spécifique, localisée au niveau de l'exon 2. Les bandes correspondant aux transcrits HLA-G1, G2, G3, G4 et G5 sont indiquées par des flèches. Les produits de la PCR coamplifiés au cours de la même réaction avec les amorces de la  $\beta$ -actine sont détectés sur la même membrane, à l'aide d'une sonde  $\beta$ -actine.

- la figure 7 illustre l'analyse RT-PCR des transcrits HLA-G dans les biopsies de tumeurs primitives de mélanomes et dans les cultures de cellules primaires MPP5 dérivées (analyse *ex vivo*). Les amorces pan-HLA-G précitées sont utilisées pour l'amplification à partir de biopsies de peau saine (HS1), de tumeurs primaires de peau (SPT1) et de tumeurs en régression (R1) obtenues à partir du même patient et à partir de cellules primaires dérivées obtenues à partir d'un tissu tumoral de peau (MPP5). Les cellules MPP5 et la biopsie SPT1 présentent des taux de transcrits HLA-G similaires. Des cellules JEG-3 sont utilisées comme contrôles de taux élevés de transcription HLA-G. Les bandes spécifiques HLA-G sont révélées par hybridation avec une sonde GR-spécifique, localisée dans l'exon 2. Les bandes correspondant aux transcrits HLA-G1, G2, G3, G4 et G5 sont indiquées par des flèches. Les produits de la PCR coamplifiés dans la même réaction avec les amorces de la  $\beta$ -actine sont détectés sur la même membrane par une sonde spécifique de la  $\beta$ -actine.

- la figure 8 illustre :

(A) la détection spécifique des transcrits HLA-G5 par RT-PCR dans des biopsies de mélanomes. L'amplification du transcrit HLA-G5 à partir de ganglions lymphatiques sains (HLN), d'une tumeur primaire de peau (SPT1) et de deux biopsies de métastases de ganglions lymphatiques (LNM1 et LNM2) est réalisée à l'aide des amorces G.526 et G.i4b. La bande correspondant au transcrit HLA-G5 est détectée par hybridation avec une sonde I4F, localisée dans l'intron 4 ; des cellules JEG-3 sont utilisées comme contrôles (taux élevés de transcription HLA-G5). La bande correspondant au transcrit HLA-G5 est indiquée par des flèches. Les produits de la PCR



coamplifiés dans la même réaction avec les amorces de la  $\beta$ -actine sont détectés sur la même membrane par une sonde spécifique de la  $\beta$ -actine ;

(B) l'analyse immunohistochimique de l'expression HLA-G soluble dans la biopsie LNM1. Des sections de la biopsie LNM1 congelées et fixées sur de l'acétone sont colorées positivement avec l'anticorps anti-mélanome HMB45 (DAKO) et l'anticorps anti-HLA-G soluble 16G1, tandis que le contrôle négatif ne se colore pas en utilisant le système peroxydase anti-souris Envision (DAKO) et l'AEC comme substrat.

Il doit être bien entendu, toutefois, que ces exemples sont donnés uniquement à titre d'illustration de l'objet de l'invention, dont ils ne constituent en aucune manière une limitation.

**EXEMPLE 1 : Analyse des profils HLA-G de différentes lignées tumorales et étude de l'inhibition de la lyse par les cellules NK.**

#### **A/ MATERIEL ET METHODES**

##### **1/ Lignées cellulaires**

La lignée cellulaire érythroleucémique humaine K562 (ATCC) et la lignée cellulaire leucémique T immature (clone YT2C2-PR) à activité NK) sont maintenues dans un milieu RPMI 1640 complété avec du sérum de veau foetal à 10%, inactivé par la chaleur, de la L-glutamine 2mM, de la gentamicine à 1  $\mu$ g/ml et de la fungizone (Sigma, Saint-Quentin, France) et cultivées à 37°C dans un incubateur, humidifié à atmosphère enrichie à 5% en CO<sub>2</sub>. Les transfectants K562 sont sélectionnés dans un milieu contenant de la généticine à 1 mg/ml (G418 sulfate, Sigma).

La lignée cellulaire humaine de choriocarcinome HLA-G-positif dénommée JEG-3 (ATCC) est cultivée dans un milieu DMEM (Sigma) supplémenté avec du sérum de veau foetal à 10%, inactivé à la chaleur, des antibiotiques et de la L-glutamine 2mM. Les lignées cellulaires ne contiennent pas de mycoplasmes.

Outre les lignées précitées, on utilise :

- des lignées de mélanome IGR (HLA-A2, A3, B58/mâle), M74 (HLA-A1, A2, B8, B14/femelle), M8 (HLA-A1, A2, B12 et B40/mâle) et DRAN (HLA-A2, A3, B7, B35, CW5, CW7),

- des tissus trophoblastiques du premier trimestre, obtenus après IVG ; ces tissus sont découpés en fines lamelles et immédiatement utilisés pour extraire l'ARN, et

- 5 - des cellules mononucléées du sang périphériques (PBMC), obtenues à partir de volontaires sains et isolées sur un gradient de densité Ficoll-Hypaque 1077.

## 2/ Anticorps monoclonaux

Les anticorps suivants sont utilisés :

- W6/32 : IgG2a, anti-chaînes  $\alpha$  de HLA de classe I associées à la  $\beta$ 2-m (Sigma) ; HCA2 : IgG anti-HLA-A et G et IgG anti-HLA-G, 87G, 4H84 et 16G1.

## 3/ RT-PCR

- L'ARN total est extrait à partir de  $10^7$  cellules à l'aide du réactif RNA NOW (Biogentex, Inc.) conformément aux recommandations du fabricant. La qualité de l'ARN est vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose à 1,5% dénaturant.
- 15 Les ADNc sont préparés à partir de 10  $\mu$ g d'ARN total traités avec de la DNase I (Boehringer Mannheim) en utilisant une amorce oligo-(dT)<sub>12-18</sub> et la transcriptase inverse M-MLV (GIBCO-BRL). Les amplifications RT-PCR HLA-G spécifiques sont réalisées en utilisant les amorces suivantes : G.257 (exon 2) et G3.U (3'UT) (Ishitani A. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1992, 89, 3947-3951 ; Kirszenbaum M. et al., *Proc.*
- 20 *Natl. Acad. Sci.*, 1994, 91, 4209-4213 et Moreau P. et al., *C.R. Acad. Sci*, 1995, 318, 837-842), pour détecter toutes les isoformes d'ARNm d'HLA-G. Une amplification spécifique de chaque forme d'ARNm d'HLA-G est réalisée avec les ensembles d'amorces suivants :

- G.526 (exon 3) et G3.U (3' UT) pour les isoformes G1, G4 et G5 ;
- 25 - G.526 (exon 3) et G.i4b (intron 4) pour l'isoforme G5 ;
- G.-3 (recouvrant partiellement les exons 2 et 4) et G3.U (3' UT) pour les isoformes G2 et G6 ;
- G.3-4 (recouvrant partiellement les exons 2 et 5) et G3.U (3' UT) pour l'isoforme G3.

- 30 Les ADNc des HLA classiques de classe I sont amplifiés comme décrit dans King et al. (*J. Immunol.*, 1996, 156, 2068-2076), en utilisant une amorce 5'

unique HLA-5P2 et 3 amorces 3', HLA-3pA, HLA-3pB et HLA-3pC qui amplifient respectivement les ARNm HLA-A, HLA-B et HLA-C.

Les amorces spécifiques DRA sont décrites dans King et al. précité.

Une co-amplification de l'ADNc de  $\beta$ -actine est réalisée dans  
5 chaque expérience avec le test Clontech (16 cycles), de manière à évaluer les quantités comparatives d'ARN dans les échantillons. Les produits PCR sont analysés par électrophorèse sur gel d'agarose à 1% et colorés à l'aide de bromure d'éthidium. La spécificité des produits PCR est confirmée par blotting alcalin des fragments dans du NaOH 0,4 N sur des membranes de Nylon (Hybond N+, Amersham, France).

10 Les sondes HLA-G spécifiques sont les suivantes :

- GR spécifique de l'exon 2,
- G.647 F (5'-CCACCACCCTGTCTTTGACT : spécifique de  
l'exon 4),
- G.I4 F (GAGGCATCATGTCTGTTAGG : spécifique de l'intron  
15 4), et
- G.927 F (5'-ATCATGGGTATCGTTGCTGG : spécifique de  
l'exon 5).

Les autres sondes sont les suivantes :

- sonde spécifique HLA-A (5'GGAGGACCAGACCCAGGACAC-  
20 G),
- sonde spécifique HLA-B (5'AGCTCCGATGACCACAACTGC)
- sonde spécifique HLA-C (5'TGTCCTAGCTGCCTAGGAG) et
- sonde spécifique HLA-DRA (TGTGATCATCCAGGCCGAG).

Les filtres sont exposés sur des films Kodak (Biomax) avec des  
25 écrans amplificateurs pendant 4 à 16 heures à -80°C.

#### **4/ Immunoprécipitation des protéines biotinylées de surface et Western blot.**

Les protéines de surface sont marquées avec de la biotine. Après lavage dans du PBS,  $1,5 \cdot 10^7$  cellules sont incubés dans 1 ml de PBS froid contenant  
30 5 ml de NHS-SS-biotine (Pierce, Rockford, IL) pendant 15 min à 4°C. Les groupes actifs résiduels sont inhibés dans 50 mM de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  pendant 10 min à 4°C. Les cellules

sont lysées dans 1 % de Triton X100/PBS. Les protéines précipitées avec l'anticorps W6/32 sont séparées sur SDS-PAGE à 12 %, transférées sur membrane de nitrocellulose et mises en présence d'un conjugué peroxydase de raifort-streptavidine. Après un lavage extensif de la membrane, la réaction colorée est réalisée en utilisant le réactif  
5 de détection de Western blotting ECL (Amersham, France), après quoi la membrane est exposée à un film Kodak à température ambiante.

### 5/ Essais de cytotoxicité.

L'activité cytolytique des cellules mononucléées du sang périphérique, des cellules NK et des cellules YT2C2-PR (cellules effectrices ou E) à l'encontre  
10 des transfectants HLA-G (cellules cibles ou T) est estimée à l'aide de tests de libération pendant 4 heures du chrome 51, dans lesquels les cellules effectrices sont mélangées avec  $5.10^3$  de cellules cibles marquées au chrome 51 (100  $\mu$ Ci de  $^{51}$ Cr-chromate de sodium, Amersham, UK), dans différents rapports E/T, dans des plaques de microtitration dont le fond est en forme de U.

15 Après 4 heures à 37°C dans un incubateur humidifié contenant 5% de CO<sub>2</sub>, 100  $\mu$ l de surnageant sont prélevés pour un comptage par scintillation en phase liquide (Wallac 1450 Microbeta, Pharmacia, France). Le pourcentage de lyse spécifique est calculé comme suit :

pourcentage de lyse spécifique = [cpm dans le puits expérimental - cpm de libération  
20 spontanée]/(cpm de libération maximale - cpm de libération spontanée)] x 100.

La libération spontanée est déterminée par incubation des cellules cibles (T) marquées avec le milieu. La libération maximale est déterminée par solubilisation des cellules cibles dans de l'HCl 0,1 M. Dans toutes les expériences, la libération spontanée est inférieure à 10% par rapport à la libération maximale. Les résultats  
25 sont présentés comme des moyennes de trois échantillons. Dans les expériences dans lesquelles les anticorps monoclonaux sont utilisés pour bloquer l'interaction HLA-G-NK, les cellules cibles sont incubées avec l'anticorps monoclonal correspondant, puis lavées et incubées avec un anticorps F(ab')<sub>2</sub> de chèvre anti-souris (Jackson Immunoresearch, USA) pour éviter la cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps (ADCC)  
30 par interaction des récepteurs pour le fragment Fc des immunoglobulines, exprimés sur les cellules NK avec le premier anticorps utilisé. Les toxicités des anticorps

monoclonaux sont également vérifiées dans chaque essai et sont toujours inférieures à 3%.

## **II - Résultats**

### **1/ Identification des différents transcrits d'HLA-G dans des 5 lignées cellulaires de mélanome.**

Les ADNc d'HLA-G de 4 lignées cellulaires de mélanome (IGR, M8, M74 et DRAN) sont amplifiés, à l'aide des amorces précédemment décrites (A. Ishitani et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1992, 89, 3947-3951 ; M. Kirszenbaum et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1994, 91, 4209-4213), dérivées des séquences spéci-  
10 fiques de l'exon 2 et de la région 3' non traduite (voir Matériel et Méthodes) (figure 1).

La lignée JEG-3 de choriocarcinome et des cellules trophoblastiques, qui présentent des taux élevés de transcrits d'HLA-G, sont utilisées comme témoins positifs et les cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC) de volontaires  
15 sains sont utilisés comme contrôle négatifs (taux faibles de transcrits HLA-G).

L'hybridation des produits de la PCR ont permis d'identifier des taux importants d'ARNm d'HLA-G dans 2 lignées cellulaires de mélanome, à savoir IGR et M74, tandis qu'aucun signal ne peut être détecté dans la lignée cellulaire de mélanome M8.

20 Dans les cellules JEG-3 et les trophoblastes, tous les transcrits d'HLA-G sont détectés (figures 1A et 1C).

Dans les cellules de mélanome IGR et DRAN, tous les transcrits sont également détectés par les amorces pan-HLA-G (figure 1A).

Cependant, les amorces pan-HLA-G ne permettent pas de distinguer  
25 entre les signaux HLA-G1 et HLA-G5, qui sont présents tous les deux, au niveau d'une bande correspondant à 1 000 pb, ni entre les signaux HLA-G2 et HLA-G1, qui comigrent sous la forme d'un fragment de 600 pb. Une identification RT-PCR permet d'isoler les isoformes à l'aide d'amorces spécifiques (P. Moreau et al., *C. R. Acad. Sci.*, 1995, 318, 837-842) (voir Matériel et Méthodes).

Les cellules IGR et DRAN expriment toutes les isoformes d'HLA-G sous forme de transcrits, HLA-G4 et HLA-G5 étant exprimés à des taux faibles (figure 1B).

Dans la lignée cellulaire de mélanome M74, les amorces pan-HLA-G 5 G détectent des bandes correspondant à HLA-G1 et HLA-G5 (1 000 pb) (signaux intenses), un signal pour HLA-G2 et G4 (600 pb), mais aucun signal pour HLA-G3 (300 pb) (figure 1A). Les amorces pour les isoformes spécifiques révèlent que dans ces cellules les isoformes G1 et G4 sont plus abondantes que dans les PBMC tandis que le taux de transcrit G5 est comparable à celui observé dans les PBMC.

10 Des taux faibles d'ARNm HLA-G2 et HLA-G6 (forme soluble d'HLA-G2) sont détectés dans ces cellules M74, tandis qu'une amplification spécifique du transcrit HLA-G3 confirme l'absence d'HLA-G3 observée avec les amorces pan-HLA-G dans ces cellules (figures 1A et 1B).

Aucun signal d'hybridation HLA-G n'est observé dans les cellules 15 M8 (figures 1A et 1B).

## **2/ Analyse des protéines HLA-G dans les cellules de mélanome.**

Pour déterminer si les transcrits d'HLA-G détectés dans les mélanomes sont traduits en protéines HLA-G, des études d'immunoprécipitation ont été effectuées avec différents anticorps monoclonaux anti-HLA de classe I.

20 La comparaison est réalisée en présence d'un contrôle positif (cellule JEG-3) et d'un contrôle négatif (cellules de mélanome M8).

Les résultats d'immunoprécipitation avec l'anticorps monoclonal W6/32 sont illustrés à la figure 3.

Avec les cellules JEG-3, l'anticorps W6/32 immunoprécipite deux 25 protéines de 45 kDa (molécule HLA-C) et de 39 kDa (isoforme HLA-G1 liée à la membrane).

Dans les cellules IGR et M8, seulement une protéine de 45 kDa est détectée.

Des résultats similaires sont obtenus par immunoprécipitation de 30 protéines de surface biotinylées (figure 3).

Ces données montrent que la protéine HLA-G1 n'est pas exprimée dans les cellules IGR, même si ces dernières expriment l'ARNm correspondant.

Cependant, l'absence de protéine HLA-G1 dans les cellules IGR n'exclut pas l'expression de 3 autres isoformes d'HLA-G (HLA-G2, G3 et G4).

5 Ces protéines ne peuvent pas être révélées par l'anticorps monoclonal W6/32, en raison de leur incapacité à s'associer avec la  $\beta 2m$ .

Pour mettre en évidence ces protéines, l'immunoprécipitation de protéines marquées à la méthionine ( $^{35}S$ -méthionine) est réalisée en utilisant des anticorps monoclonaux qui reconnaissent l'HLA-G libre, l'HLA-G dénaturée et l'HLA-A  
10 (anticorps HCA2) et un épitope localisé au niveau du domaine  $\alpha 1$  présent dans toutes les isoformes de la protéine HLA-G (anticorps monoclonal Ig anti HLA-G).

L'anticorps monoclonal révèle la présence de la protéine HLA-G1 de 39 kDa dans les cellules JEG-3 et DRAN et son absence dans les cellules IGR (figure 4).

15 Des bandes additionnelles, qui migrent à 32-34 kDa et à 18 kDa, qui correspondent respectivement à la taille de la protéine HLA-G2 et/ou de la protéine HLA-G4 ou G3, sont détectées dans les cellules IGR aussi bien avec l'anticorps monoclonal Ig anti HLA-G qu'avec l'anticorps HCA2 (figure 4).

Les bandes additionnelles, spécifiques de la protéine HLA-G, ne  
20 sont pas observées dans les cellules M74 et M8 qui ne présentent pas les transcrits d'HLA-G correspondants (figure 4).

### **3/ Protection de la lignée IGR de la cytolyse induite par les cellules NK.**

Les cellules YT2C2-PR sont utilisées comme cellules effectrices  
25 NK.

La lignée cellulaire IGR, qui exprime les isoformes HLA-G2 et/ou G4 et G3 et la lignée DRAN, qui exprime HLA-G1 (figure 5), abolissent la lyse induite par le clone YT2C2-PR.

La lignée cellulaire de mélanome M74, qui exprime les antigènes  
30 classiques du CMH de classe I mais qui présente un défaut sélectif dans la transcrip-

tion et l'expression des isoformes HLA-G2 et HLA-G3 est lysée par le clone YT2C2-PR.

Une lyse est également observée avec la lignée cellulaire M8, qui exprime les antigènes classiques du CMH de classe I, mais qui ne transcrit aucun  
5 ARNm d'HLA-G (figures 1 et 5).

Pour montrer que seules les HLA-G sont impliquées dans cette inhibition de la lyse induite par les cellules NK, plusieurs lignées cellulaires EBV-B n'exprimant aucune HLA-G mais partageant au moins une allèle HLA-A, B ou C avec la lignée IGR sont utilisées comme cellules cibles.

10 Toutes ces lignées EBV-B sont lysées par le clone YT2C2-PR, montrant que les antigènes HLA-A, B et C ne sont pas impliqués dans la protection des mélanomes IGR et DRAN, de la lyse YT2C2-PR (figure 5).

Pour montrer que l'inhibition de la lyse, induite par le clone YT2C2-PR par les cellules IGR, n'est pas due à un signal transmis par cette lignée cellulaire  
15 mais est bien liée à une résistance intrinsèque de ces cellules IGR aux cellules NK, les cellules IGR ont été utilisées comme inhibiteurs, dans un test de cytotoxicité dans lequel les cellules cibles (T) sont des cellules M8 et les cellules YT2C2-PR, les cellules effectrices (E).

La figure 5 B montre que les cellules IGR inhibent de manière efficace la lyse des cellules M8 par le clone YT2C2-PR ; cette inhibition est proportionnelle au nombre de cellules IGR utilisé pour le test compétitif.

#### **EXEMPLE 2 : Détection des transcrits et des protéines HLA-G dans des biopsies de mélanomes.**

##### **A/ MATERIEL ET METHODES**

##### **25 1/ Échantillons tumoraux**

Des biopsies sont effectuées à partir d'échantillons tissulaires de patients.

Immédiatement après le prélèvement, les échantillons sont congelés dans l'azote liquide et stockés jusqu'à l'extraction de l'ARN.



## 2/ Immunohistochimie.

Des méthodes standards sont utilisées pour réaliser l'immunohistochimie sur des coupes réalisées à partir des biopsies de mélanome, fixées à l'acétone, rincées dans du PBS et bloquées dans du sérum de lapin normal (DAKO) dans du PBS.

Les échantillons sont incubés avec l'anticorps primaire pendant 1 h à température ambiante, puis sont incubés avec un anticorps secondaire (Ig de lapin anti-souris conjugué avec du FITC) (DAKO).

Les sections sont contre-colorées avec un colorant nucléaire (DAPI, Sigma) et préparées dans un milieu convenable. La fluorescence est analysée avec un microscope confocal Io24 MRC (Bio-Rad). Les anticorps suivants sont utilisés : W6/32 : IgG2a anti-chaînes lourdes d'HLA-G de classe I associées à de la  $\beta$ 2-microglobuline (Sigma) et 87G : IgG2b anti-HLA-G qui détecte l'isoforme HLA-G1.

Les autres techniques sont identiques à celles de l'exemple 1.

## 15 B/ RESULTATS

### 1/ Analyse de la transcription HLA-G dans des biopsies de mélanome *ex-vivo*.

Tous les transcrits d'HLA-G sont détectés à des taux importants dans certaines biopsies de mélanome, alors que seule la bande de 1 000 pb est détectée dans la peau humaine saine (figures 2 et 6). Ces résultats ont été confirmés sur d'autres biopsies et montrent que les taux importants de transcription observés dans les cellules de mélanome, sont spécifiques de ces derniers et non observable dans le tissu sain.

De manière plus précise, des taux élevés de transcription HLA-G sont détectés de manière spécifique dans des tumeurs primaires et dans des métastases, alors que des taux basaux de transcrits HLA-G et une absence d'expression de protéine HLA-G sont observés dans la peau saine ou dans des ganglions lymphatiques normaux (figure 6A).

L'analyse de la peau saine (HS1), des tumeurs primaires de peau (SP1) et d'un site de régression tumorale (R1) dans une tumeur primaire de peau d'un même patient permet la détection d'un taux élevé de transcrits HLA-G et d'expression

de protéines au niveau du site tumoral primaire, tandis qu'aussi bien la peau saine que le site de régression tumorale présentent des taux basaux de transcrits HLA-G et l'absence complète de l'expression de protéines HLA-G1 (figure 7).

Les cellules primaires en culture (MPP5) dérivées de la tumeur  
5 primaire SP1 présentent également des taux élevés de transcrits HLA-G (figure 7).

## **2/ Analyse de la transcription HLA-G soluble dans des biopsies de mélanome *ex-vivo***

Une amplification spécifique des transcrits (ARNm) correspondant à l'isoforme soluble HLA-G5, dans les biopsies de mélanomes montrent que l'on  
10 détecte des taux élevés de transcrits HLA-G5 dans certaines biopsies de mélanomes dont on a montré qu'elles présentent des taux élevés de transcrits correspondant aux isoformes membranaires d'HLA-G (figure 8).

Par ailleurs, dans d'autres cas, on observe une dissociation entre les taux d'HLA-G5 et les taux des autres transcrits HLA-G : dans des biopsies de méla-  
15 nomes dans lesquelles on a préalablement observé des taux élevés d'HLA-G1, G2, G3 et G4, on n'observe pas de transcrits HLA-G5.

La tumeur primaire de peau SP1 et les cellules en culture correspon- dantes MPP5 ainsi que les métastases de ganglions lymphatiques LNM2 présentent des taux élevés de transcrits HLA-G correspondant à des isoformes d'HLA-G liées à  
20 la membrane (figure 8), alors qu'on ne détecte pas de transcrits HLA-G5 dans le même échantillon.

## **3/ Analyse des protéines membranaires et solubles dans des biopsies de mélanomes**

Des taux élevés de transcrits HLA-G sont corrélés à la détection  
25 spécifique de l'expression de protéine HLA-G par un anticorps monoclonal anti-HLA-G (anticorps 87G) dans des biopsies de mélanomes. En effet, l'analyse immunohisto- chimique de l'expression HLA-G dans une biopsie de ganglions lymphatiques méta- stasiques (LNM2) permet d'observer un marquage positif de LNM2 aussi bien avec l'anticorps 87G qu'avec l'anticorps W6/32, alors que le contrôle négatif constitué par  
30 la peau saine du même patient n'est pas coloré par l'anticorps anti-HLA-G.

Afin d'affiner cette étude, un anticorps qui détecte spécifiquement la protéine HLA-G soluble, l'anticorps 16G1 (Lee et al., Immunity, 1995, 3, 591-600), permet de démontrer l'expression de la protéine HLA-G soluble dans la biopsie de ganglions lymphatiques d'un patient présentant des taux élevés de transcrits HLA-G5 (figure 8).

L'analyse immunohistochimique permet le marquage de cette biopsie tandis que l'on n'observe aucune expression détectable en utilisant le même anticorps dans une biopsie de mélanomes d'un patient présentant des taux élevés des autres isoformes d'HLA-G.

En effet, l'analyse immunohistochimique de l'expression d'HLA-G soluble dans la biopsie LNM2, montre que des sections de biopsies LNM2 fixées à l'acétone sont colorées positivement avec l'anticorps anti-mélanome HMB45 (DAKO, Glostrup, ; SKELTON et al., Am. J. Dermatopathol., 1991, 13, 543-550) et l'anticorps anti-HLA-G soluble 16G1, tandis que le contrôle négatif n'est pas coloré.

Ainsi que cela ressort de ce qui précède, l'invention ne se limite nullement à ceux de ses modes de mise en œuvre, de réalisation et d'application qui viennent d'être décrits de façon plus explicite ; elle en embrasse au contraire toutes les variantes qui peuvent venir à l'esprit du technicien en la matière, sans s'écarter du cadre, ni de la portée, de la présente invention.

### REVENDICATIONS

1°) Méthode d'établissement du profil de transcription HLA-G d'une tumeur solide, en vue de la sélection d'un traitement adapté à ladite tumeur et/ou en vue de la surveillance de l'évolution de ladite tumeur, caractérisée en ce qu'elle

5 comprend :

- (i) le prélèvement d'un échantillon tumoral ;
- (ii) l'extraction de l'ARNm ;
- (iii) la transcription inverse (RT) dudit ARN ;
- (iv) les amplifications successives ou concomitantes des ADNc
- 10 obtenus en (iii), en présence d'amorces spécifiques de chaque isoforme d'HLA-G et l'analyse des produits d'amplification obtenus, par électrophorèse et/ou hybridation spécifique et
- (v) l'établissement du profil de transcription HLA-G dudit échantillon.

15 2°) Méthode d'établissement du profil d'expression HLA-G d'une tumeur solide, en vue de la sélection d'un traitement adapté à ladite tumeur et/ou en vue de la surveillance de l'évolution de ladite tumeur, caractérisée en ce qu'elle comprend :

- (i) le prélèvement d'un échantillon tumoral,
- 20 (ii) la préparation d'une coupe histologique à partir dudit échantillon,
- (iii) le marquage des cellules de l'échantillon obtenu en (ii) avec des anticorps spécifiques d'isoformes membranaires et solubles HLA-G, et
- (iv) l'établissement du profil d'expression HLA-G dudit échantillon,
- 25 par détection des cellules marquées.

3°) Méthode d'établissement du profil d'expression HLA-G d'une tumeur solide, en vue de la sélection d'un traitement adapté à ladite tumeur et/ou en vue de la surveillance de l'évolution de ladite tumeur, caractérisée en ce qu'elle comprend :

- 30 (i) le prélèvement d'un échantillon tumoral,

- (ii) éventuellement le marquage des cellules dudit échantillon,
- (iii) la lyse des cellules,
- (iv) la mise en contact des cellules lysées avec différents anticorps dirigés contre les antigènes HLA de classe I, pour former, éventuellement des
- 5 complexes isoforme d'HLA-G/anticorps, et
- (v) l'établissement du profil d'expression HLA-G dudit échantillon, par détection des complexes formés à l'étape (iv).

4°) Méthode de sélection de facteurs de régulation de la transcription et/ou de l'expression des HLA-G par des cellules tumorales, laquelle méthode est

10 caractérisée en ce qu'elle comprend :

- (i) le prélèvement d'un échantillon tumoral,
- (ii) l'isolement des cellules tumorales à partir dudit échantillon,
- (iii) la mise en culture primaire des cellules tumorales obtenues en
- (ii),
- 15 (iv) l'addition de la substance à tester,
- (v) la visualisation de l'effet obtenu par l'établissement du profil de transcription et/ou d'expression HLA-G desdites cellules après traitement avec ladite substance à tester, et
- (vi) le test *in vitro* de l'effet du traitement sur la réponse anti-
- 20 tumorale.

5°) Vaccin anti-tumoral, apte à être utilisé dans des tumeurs solides exprimant au moins une isoforme d'HLA-G, caractérisé en ce qu'il est sélectionné dans le groupe constitué par des cellules tumorales autologues ou un antigène HLA-G5 soluble ou un fragment de celui-ci.

25 6°) Vaccin selon la revendication 5, caractérisé en ce que lorsque ledit vaccin est constitué de cellules tumorales de l'individu à traiter exprimant au moins une isoforme d'HLA-G, lesdites cellules étant modifiées de manière à induire a production d'anticorps anti-HLA-G.

7°) Vaccin selon la revendication 5, caractérisé en ce que ledit anti-

30 gène HLA-G soluble ou un fragment de celui-ci est couplé à une protéine appropriée

et éventuellement associé à un adjuvant tel que l'hydroxyde d'aluminium ou le phosphate de calcium.

8°) Composition anti-tumorale, apte à être utilisée dans des tumeurs solides exprimant au moins une isoforme d'HLA-G, caractérisée en ce qu'elle est  
5 essentiellement constituée d'anticorps anti-HLA-G.

9°) Composition anti-tumorale, apte à être utilisée dans des tumeurs solides exprimant au moins une isoforme d'HLA-G, caractérisée en ce qu'elle est essentiellement constituée par au moins un facteur de régulation de la transcription et/ou de l'expression des HLA-G.

10 10°) Composition selon la revendication 9, caractérisée en ce que ledit facteur de régulation est sélectionné dans le groupe constitué par les facteurs de régulation obtenus à l'aide de la méthode selon la revendication 4, les facteurs antagonistes des agents d'activation des HLA-G, les acides nucléiques anti-sens et les inhibiteurs hormonaux de la transcription et/ou de l'expression desdites HLA-G.

15 11°) Produits contenant des anticorps anti-HLA-G et des facteurs de régulation de l'expression des HLA-G, comme produits de combinaison pour une utilisation simultanée, séparée ou étalée dans le temps, dans le traitement des tumeurs solides exprimant au moins une isoforme d'HLA-G.

20 12°) Modèle d'étude de la transcription et/ou de l'expression des HLA-G, caractérisé en ce qu'il est constitué par une culture de cellules établie à partir d'une biopsie de tissu tumoral.

25 13°) Méthode de surveillance de l'évolution d'une tumeur exprimant HLA-G, caractérisée en ce qu'elle comprend le dosage de la forme soluble d'HLA-G dans les sérums de patients, en tant que facteur pronostic de la dissémination tumorale ou de la capacité d'une tumeur à former des métastases.

1/12

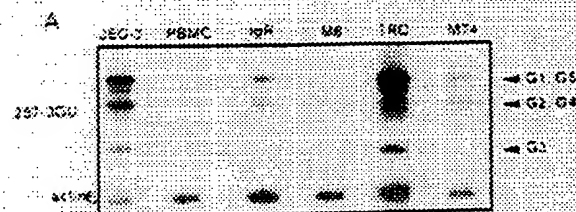


FIGURE 1A

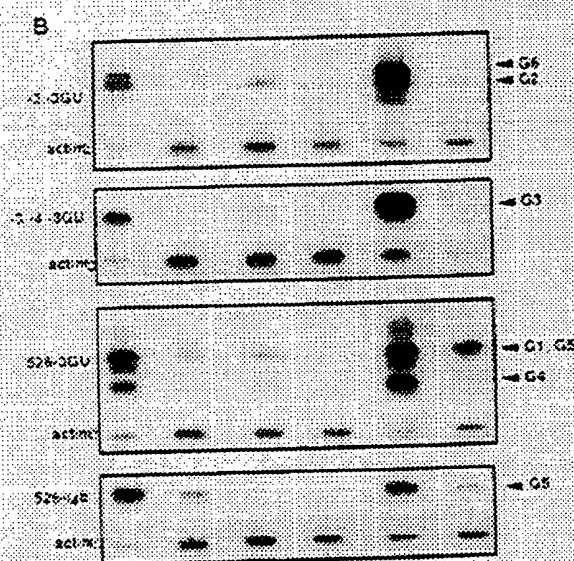


FIGURE 1B

2/12

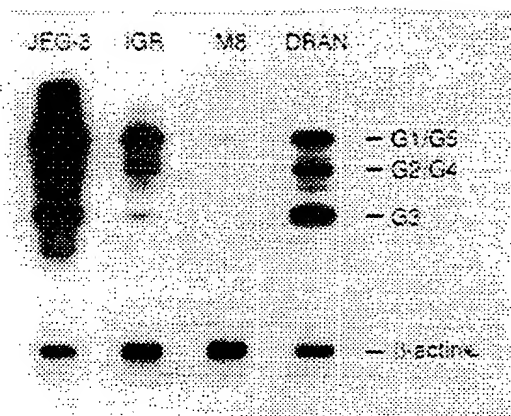


FIGURE 1C

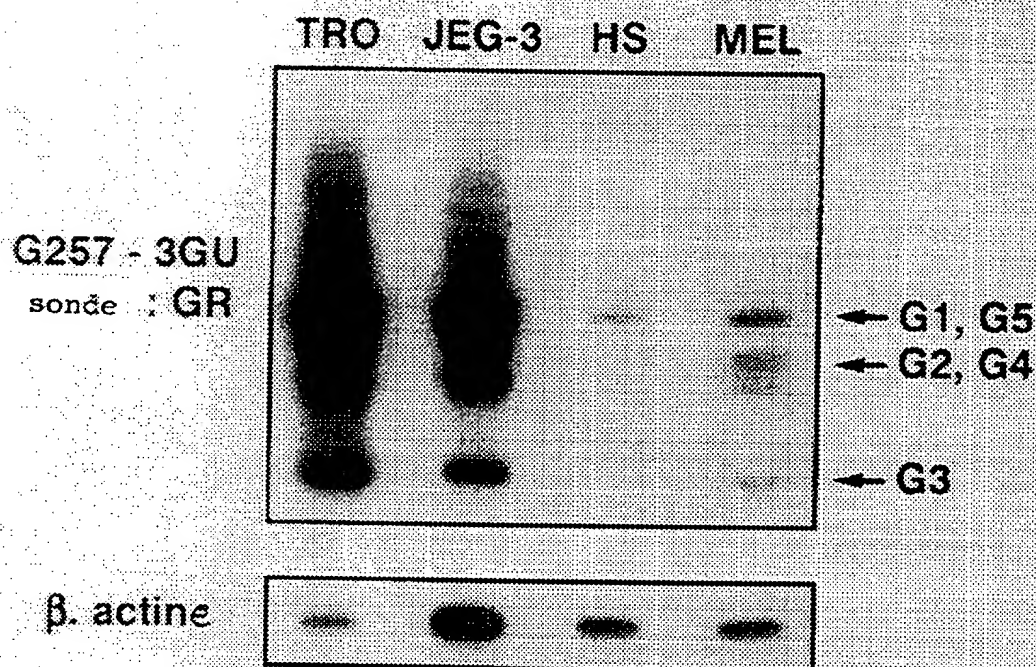


FIGURE 2



3/12

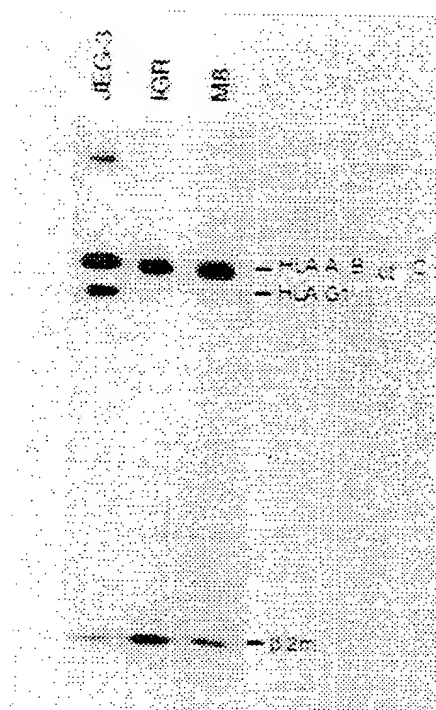


FIGURE 3

4/12

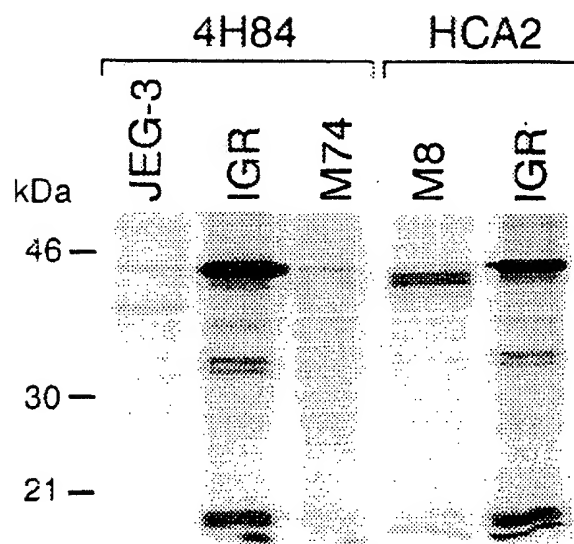


FIGURE 4

5/12

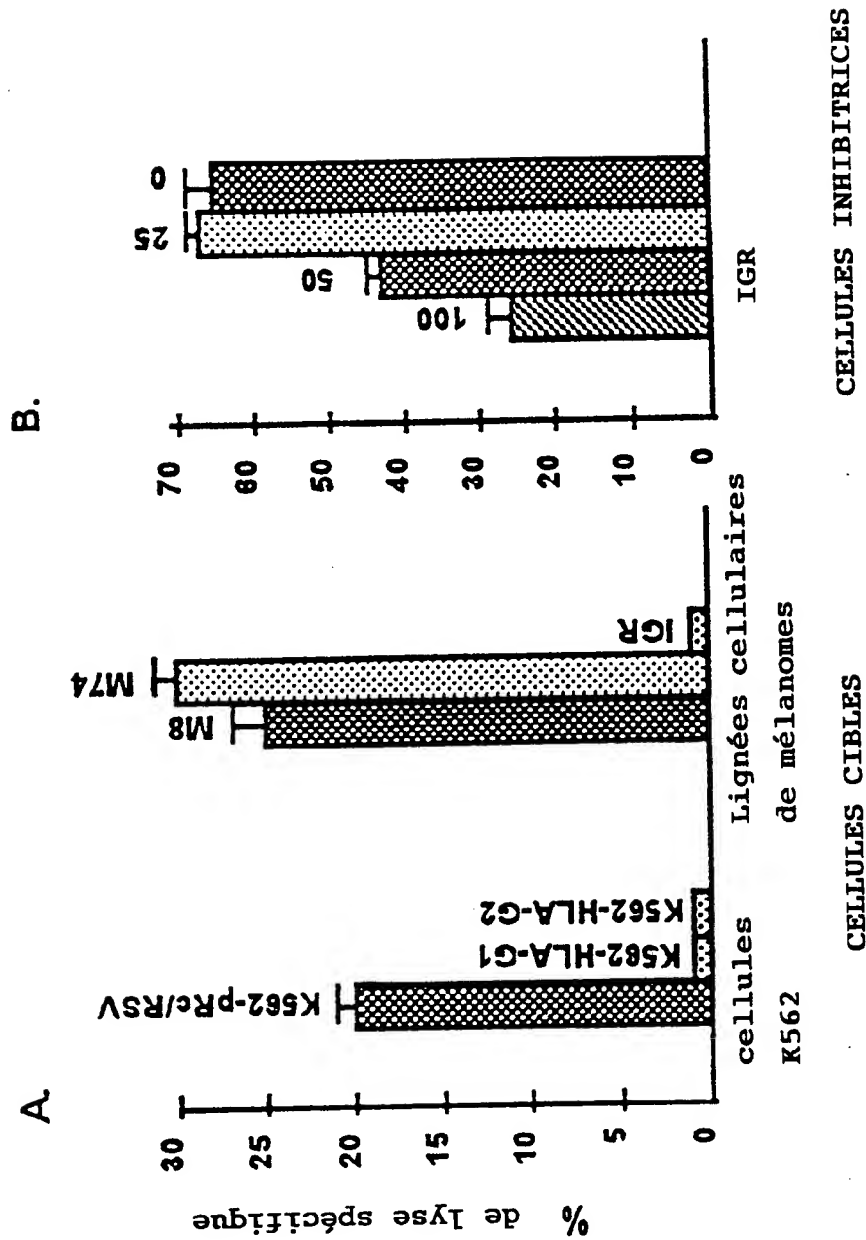


FIGURE 5B

FIGURE 5A

6/12

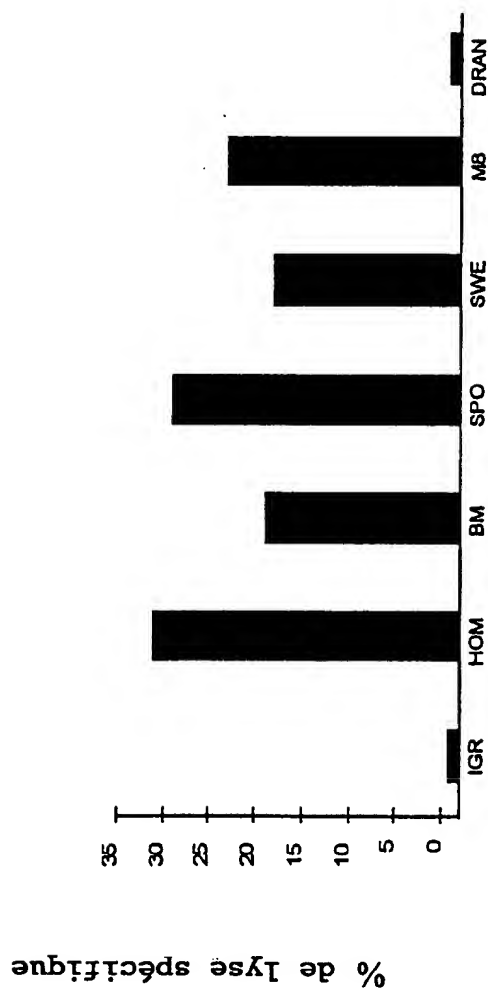


FIGURE 5C

7/12

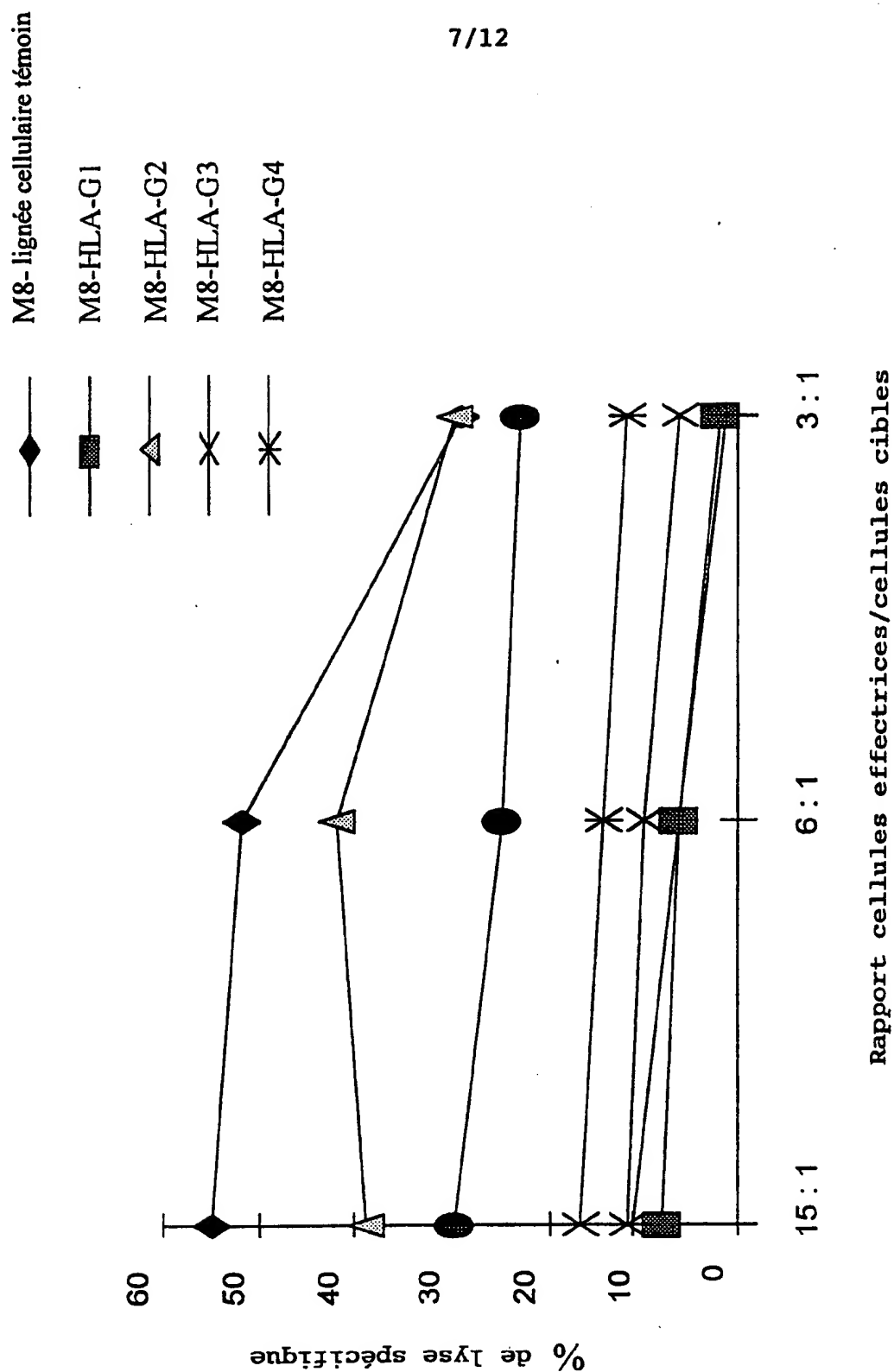
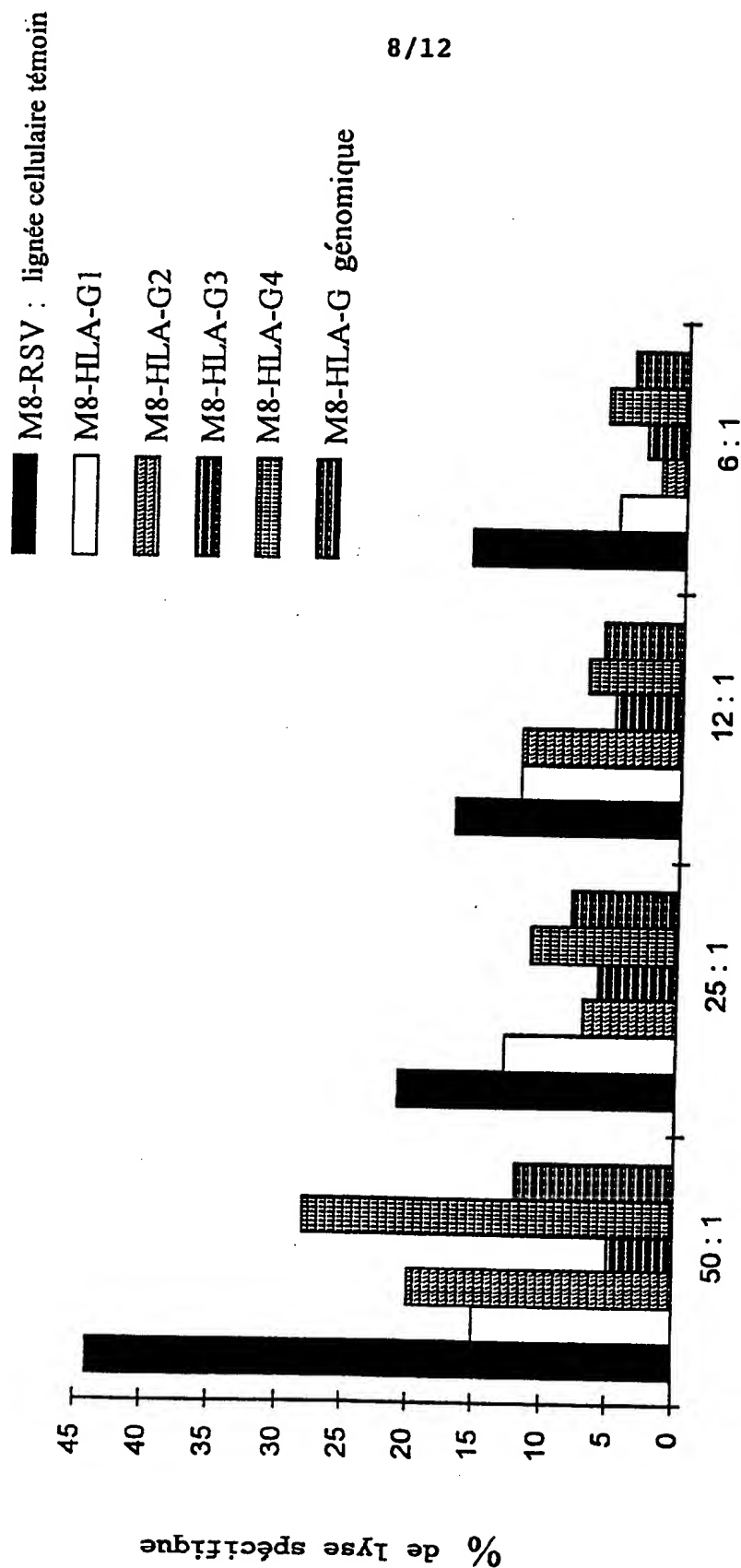


FIGURE 5D

8/12



Rapport cellules effectrices/cellules cibles

FIGURE 5E

9 / 12

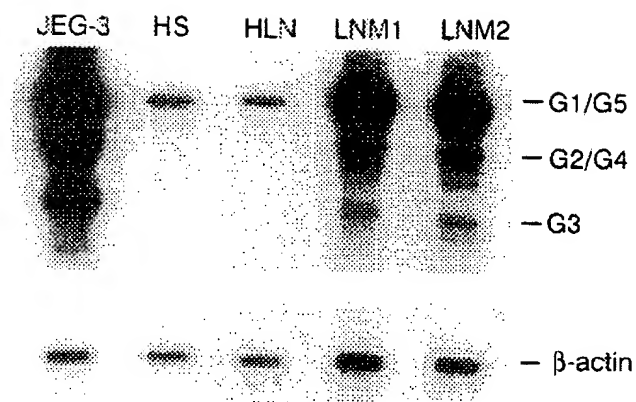


FIGURE 6

10/12

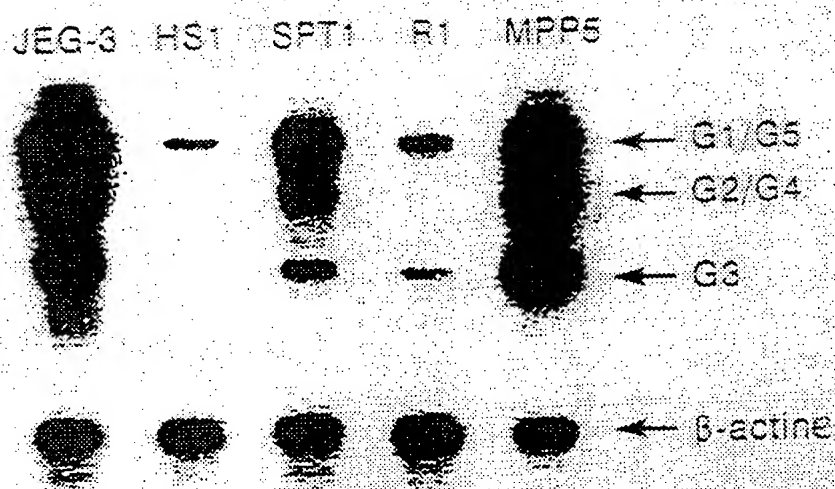


FIGURE 7



11/12

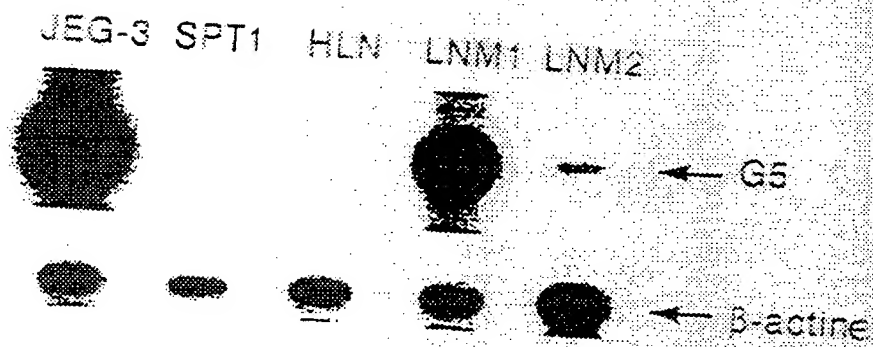


FIGURE 8A

12/12

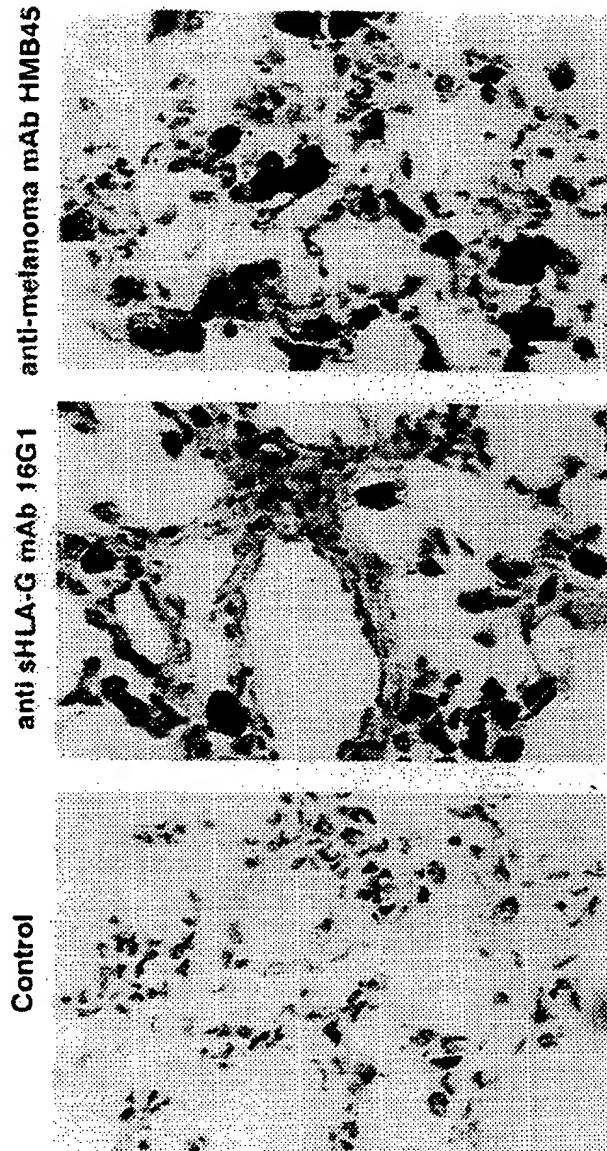


FIGURE 8B

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Application No

PCT/FR 99/00386

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 A61K39/00 C07K16/28 C07K14/705 C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 A61K C07K C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	AMIOT ET AL: "HLA - G transcription studies during the different stages of normal and malignant hematopoiesis" TISSUE ANTIGENS, vol. 48, no. 5, 1 November 1996, pages 609-614, XP002086255 see the whole document	1,3,4,9, 10,12,13
X	AMIOT ET AL: "Distribution of HLA - G alternative mRNAs including soluble forms in normal lymphocytes and in lymphoid cell-derived leukemia" EUROPEAN JOURNAL OF IMMUNOGENETICS, vol. 23, no. 4, 1 August 1996, pages 311-320, XP002086256 see the whole document	1,3,4,9, 10,12,13
	-/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

### \* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

3 June 1999

Date of mailing of the international search report

10/06/1999

Name and mailing address of the ISA  
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Charles, D

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Application No

PCT/FR 99/00386

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	EP 0 677 582 A (COMMISSARIAT ENERGIE ATOMIQUE) 18 October 1995 cited in the application see page 5, line 2 - line 17; claims 16,19,20,27,30-32 see page 7, line 8 - line 11 ---	5,7,8,11
Y,P	P. PAUL ET AL.: "HLA-G EXPRESSION IN MELANOMA: A WAY FOR TUMOR CELLS TO ESCAPE FROM IMMUNOSURVEILLANCE" PROCEEDINGS OF NATURAL ACADEMY OF SCIENCES, USA, vol. 95, April 1998, pages 4510-4515, XP002100587 see page 4510, column 2, paragraph 1 - paragraph 3 see page 4511, column 1, paragraph 3 see page 4514, column 2, paragraph 4 see page 4515, column 1, paragraph 2 ---	5,7,8,11
Y	EP 0 563 627 A (BIO DEFENCE INST CO LTD) 6 October 1993 see page 2, line 20 - line 33; claims 4,5 see page 3, line 10 - line 12 ---	5,8
A	WO 96 31604 A (UNIV CALIFORNIA) 10 October 1996 see the whole document ---	2,3
A	Y. YANG ET AL.: "EXPRESSION OF HLA-G IN HUMAN MONONUCLEAR PHAGOCYTES AND SELECTIVE INDUCTION BY IFN-GAMMA" THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 156, 1996, pages 4224-4231, XP002100588 see page 4224, column 2, paragraph 2 see page 4225, column 2, paragraph 2 see page 4230, column 1, paragraph 2 - paragraph 3 ---	8,11
A	MOREAU ET AL: "Transcrit différentiels du gène du CMH" COMPTE RENDUS DES SEANCES DE L'ACADEMIE DES SCIENCES SERIE III: SCIENCES DE LA VIE, vol. 318, 1 January 1995, pages 837-842, XP002086257 cited in the application see the whole document --- -/--	

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. l. Application No

PCT/FR 99/00386

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KIRSZENBAUM ET AL: "An alternatively spliced form of HLA-G mRNA" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, vol. 91, 1 May 1994, pages 4209-4213, XP002086258 cited in the application ---	
A	PEREZ ET AL: "The CD94/NKG2-A inhibitory receptor complex is involved in natural killer cell-mediated recognition of cells expressing HLA-G1" JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 158, no. 12, 15 June 1997, pages 5736-5743, XP002086259 ---	
A	ROUAS ET AL: "The alpha1 domain of HLA-G1 and HLA-G2 inhibits cytotoxicity induced by natural killer cells: is HLA - G the public ligand for natural killer cell inhibitory receptors?" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, vol. 94, 1 May 1997, pages 5249-5254, XP002086260 cited in the application ---	
A	ROUAS ET AL: "Direct evidence to support the role of HLA - G in protecting the fetus from maternal uterine natural killer cytotoxicity" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, vol. 94, 1 October 1997, pages 11520-11525, XP002086261 -----	

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 99/00386

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0677582	A	18-10-1995	FR 2717498 A US 5856442 A	22-09-1995 05-01-1999
EP 0563627	A	06-10-1993	JP 5246889 A AU 3398793 A BR 9300764 A CA 2090957 A CN 1079400 A CZ 9300342 A FI 930976 A HU 67859 A NZ 247057 A SK 15993 A ZA 9301558 A	24-09-1993 09-09-1993 28-09-1993 06-09-1993 15-12-1993 19-01-1994 06-09-1993 23-03-1995 26-10-1995 06-10-1993 27-09-1993
WO 9631604	A	10-10-1996	AU 696118 B AU 5256896 A CA 2213620 A EP 0819171 A JP 11503320 T	03-09-1998 23-10-1996 10-10-1996 21-01-1998 26-03-1999

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

De: Je internationale No

PCT/FR 99/00386

## A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 6 A61K39/00 C07K16/28 C07K14/705 C12Q1/68

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

## B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 A61K C07K C12Q

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

## C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	AMOT ET AL: "HLA - G transcription studies during the different stages of normal and malignant hematopoiesis" TISSUE ANTIGENS, vol. 48, no. 5, 1 novembre 1996, pages 609-614, XP002086255 voir le document en entier ---	1,3,4,9, 10,12,13
X	AMOT ET AL: "Distribution of HLA - G alternative mRNAs including soluble forms in normal lymphocytes and in lymphoid cell-derived leukemia" EUROPEAN JOURNAL OF IMMUNOGENETICS, vol. 23, no. 4, 1 août 1996, pages 311-320, XP002086256 voir le document en entier --- -/--	1,3,4,9, 10,12,13

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

### \* Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- "Z" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

3 juin 1999

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

10/06/1999

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Charles, D

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	EP 0 677 582 A (COMMISSARIAT ENERGIE ATOMIQUE) 18 octobre 1995 cité dans la demande voir page 5, ligne 2 - ligne 17; revendications 16,19,20,27,30-32 voir page 7, ligne 8 - ligne 11 ---	5,7,8,11
Y,P	P. PAUL ET AL.: "HLA-G EXPRESSION IN MELANOMA: A WAY FOR TUMOR CELLS TO ESCAPE FROM IMMUNOSURVEILLANCE" PROCEEDINGS OF NATURAL ACADEMY OF SCIENCES, USA, vol. 95, avril 1998, pages 4510-4515, XP002100587 voir page 4510, colonne 2, alinéa 1 - alinéa 3 voir page 4511, colonne 1, alinéa 3 voir page 4514, colonne 2, alinéa 4 voir page 4515, colonne 1, alinéa 2 ---	5,7,8,11
Y	EP 0 563 627 A (BIO DEFENCE INST CO LTD) 6 octobre 1993 voir page 2, ligne 20 - ligne 33; revendications 4,5 voir page 3, ligne 10 - ligne 12 ---	5,8
A	WO 96 31604 A (UNIV CALIFORNIA) 10 octobre 1996 voir le document en entier ---	2,3
A	Y. YANG ET AL.: "EXPRESSION OF HLA-G IN HUMAN MONONUCLEAR PHAGOCYTES AND SELECTIVE INDUCTION BY IFN-GAMMA" THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 156, 1996, pages 4224-4231, XP002100588 voir page 4224, colonne 2, alinéa 2 voir page 4225, colonne 2, alinéa 2 voir page 4230, colonne 1, alinéa 2 - alinéa 3 ---	8,11
A	MOREAU ET AL: "Transcrit différentiels du gène du CMH" COMPTE RENDUS DES SEANCES DE L'ACADEMIE DES SCIENCES SERIE III: SCIENCES DE LA VIE, vol. 318, 1 janvier 1995, pages 837-842, XP002086257 cité dans la demande voir le document en entier ---	
	---	

-/--



## C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>KIRSZENBAUM ET AL: "An alternatively spliced form of HLA-G mRNA"  PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA,  vol. 91, 1 mai 1994, pages 4209-4213,  XP002086258  cité dans la demande</p> <p>----</p>	
A	<p>PEREZ ET AL: "The CD94/NKG2-A inhibitory receptor complex is involved in natural killer cell-mediated recognition of cells expressing HLA-G1"  JOURNAL OF IMMUNOLOGY,  vol. 158, no. 12, 15 juin 1997, pages  5736-5743, XP002086259</p> <p>----</p>	
A	<p>ROUAS ET AL: "The alpha1 domain of HLA-G1 and HLA-G2 inhibits cytotoxicity induced by natural killer cells: is HLA - G the public ligand for natural killer cell inhibitory receptors?"  PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA,  vol. 94, 1 mai 1997, pages 5249-5254,  XP002086260  cité dans la demande</p> <p>----</p>	
A	<p>ROUAS ET AL: "Direct evidence to support the role of HLA - G in protecting the fetus from maternal uterine natural killer cytotoxicity"  PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA,  vol. 94, 1 octobre 1997, pages  11520-11525, XP002086261</p> <p>-----</p>	

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Der le internationale No

PCT/FR 99/00386

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP 0677582 A	18-10-1995	FR 2717498 A US 5856442 A	22-09-1995 05-01-1999
EP 0563627 A	06-10-1993	JP 5246889 A AU 3398793 A BR 9300764 A CA 2090957 A CN 1079400 A CZ 9300342 A FI 930976 A HU 67859 A NZ 247057 A SK 15993 A ZA 9301558 A	24-09-1993 09-09-1993 28-09-1993 06-09-1993 15-12-1993 19-01-1994 06-09-1993 23-03-1995 26-10-1995 06-10-1993 27-09-1993
WO 9631604 A	10-10-1996	AU 696118 B AU 5256896 A CA 2213620 A EP 0819171 A JP 11503320 T	03-09-1998 23-10-1996 10-10-1996 21-01-1998 26-03-1999